

AUS DER I.FRAUENKLINIK UND HEBAMMENSCHULE
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof.Dr.J.Zander

HOCHMOLEKULARE FIBRINOGENERIVATE
BEI ASPHYKTISCHEN UND NORMALEN NEUGEBORENE
SOWIE DEREN MÜTTERN UNTER DER GEBURT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Renate Gastroph
aus
Würzburg

- 1973 -

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter : Priv.-Doz. Dr. med. H. Graeff

Mitberichterstatter : Prof. Dr. med. J. Zander

Dekan : Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 30. Juli 1974



Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	SEITE
A) EINLEITUNG	5
B) MATERIAL UND METHODEN	6
1. Gesammelte Proben - Einteilung	6
2. Blutentnahme	9
3. Thrombozytenzählung	10
4. Äthanoltest	10
5. Reinigungsverfahren	10
6. Agarose-Gel-Chromatographie	11
7. Radiale Immundiffusion	11
8. Thrombingerinnungszeit	11
9. Die PAA-Gel-Elektrophorese	12
10. Die Intra-Gel-Immundiffusion	13
11. Die Immunelektrophorese	13
C) ERGEBNISSE	15
1. I.Versuchsreihe: a) Plasmen Neugeborener mit positivem Äthanoltest	15
b) Plasmen Neugeborener mit negativem Äthanoltest	19
II.Versuchsreihe: a) Plasmen Neugeborener mit positivem Äthanoltest und deren Müttern	23
b) Plasmen Neugeborener mit negativem Äthanoltest und deren Müttern	27
D) DISKUSSION	30
E) ZUSAMMENFASSUNG	35
F) LITERATURVERZEICHNIS	36

A) EINLEITUNG.

Von den zahlreichen Erkrankungen, die zur disseminierten intravasalen Gerinnung führen können, konzentrierten sich unsere Bemühungen auf die beim Neugeborenen auftretende Hypoxie und auf die Hyperkoagulabilität während der Schwangerschaft.

Nachdem lösliche Fibrinmonomerkomplexe im Nabelvenenblut asphyktischer Neugeborener durch den Äthanoltest nachgewiesen wurden (KUHN und Mitarbeiter 1971) und Fibrinogenderivate mit höherem Molekulargewicht als dem des Fibrinogens im Plasma von Patienten mit Zeichen disseminierter intravasalen Gerinnung beobachtet wurden (FLETCHER und Mitarbeiter 1970 ; VERMYLEN und Mitarbeiter 1971 ; GRAEFF und Mitarbeiter 1971 : GRAEFF, von HUGO 1972), versuchten wir mit Hilfe der Agarose-Gel-Chromatographie, der PAA-Gel-Elektrophorese und Intra-Gel-Immunpräzipitation von gepooltem mütterlichen und Neugeborenen-Plasma genauere Informationen über die löslichen Fibrinmonomerkomplexe zu erhalten.

B) MATERIAL UND METHODEN.

1. GESAMMELTE PROBEN - EINTEILUNG.

Gesammelt wurden insgesamt 46 Blutproben und im Laufe der Untersuchungen in 22 Fällen auch die der Mütter. Eine Auswahl erfolgte dabei nicht. Die Gewinnung erfolgte unter annähernd gleichen Bedingungen.

An klinischen Daten wurde besonders geachtet auf intra- und extrauterine Herzfrequenz, Apgar-Wert nach 1 und 5 Minuten und Daten der Blutgasanalysen. Erkrankungen der Mütter wurden ebenso besonders vermerkt.

Die Einteilung erfolgte gemäß dem Ergebnis des Äthanoltestes in 3 Gruppen:

Positiver Äthanoltest,
zweifelhafte Ergebnis,
negativer Äthanoltest.

Da zwischen 3 - 5 ml Plasma gewonnen werden konnte, wurde aus den für die nachfolgenden chromatographischen Untersuchungen herangezogenen Plasmen von zunächst 12 asphyktischen Neugeborenen mit positivem Äthanoltest, dann im Teil II von weiteren 11 asphyktischen Neugeborenen ein Pool gebildet:

Gruppe I_a

Gruppe II_a

(siehe TABELLE 1 und 2).

Ihnen wurde jeweils als Kontrollgruppe entsprechende Mengen von 12 bzw. 11 gesunden Neugeborenen mit negativem Äthanoltest gegenübergestellt:

Gruppe I_b

Gruppe II_b

(siehe TABELLE 1 und 2).

GRUPPE Ia: NEUGEBORENE MIT POSITIVEM ÄTHANOLTEST.

PLASMA GEWICHT APGAR PH pCO_2 HCO_3^- THROMBOCYTEN ÄTHANOLTEST ENTBINDUNGS- BESONDER-
LÄNGE 1, 5, ART HEITEN

B.	3120/51	9	10	150.000	+	spontan	
W.	3110/50	8	9	7,22/17/44	+	Vakuum	
L.	4120/54	10		7,34/19/34	+	spontan	grünes Fruchtw.
M.	3420/53	9			+	Sectio	alte l. Para
L.	2950/49	9			+	Sectio	
M.	4920/58	8	9		+	Sectio	
S.	3590/45	4	5	7,14/15/46	+	Sectio	
H.	2750/48	7	10		+	Sectio	^h r-Inkompatibilität
M.	2440/50	7	9		+	Vakuum	Pädatrophie
D.	2850/	9		7,28/20/53	+	spontan	
M.	2050/45	9	9	7,14/14/38	+	spontan	
W.	3710/52	2	8	6,92/11/88	+	GanzeExtraktion HT-Alterat.	

GRUPPE I b: NEUGEBORENE MIT NEGATIVEM ÄTHANOLTEST.

B.	3580/	9	10	370.000	-	spontan	
N.	2970/49	9	9	7,20/16/48	-	spontan	
C.	3380/53	9		315.000	-	spontan	
E.	3470/51	10		330.000	-	spontan	
H.	3650/52	10		400.000	-	Vakuum	alte l. Para
U.	3100/49	9	10	300.000	-	Sectio	
S.	3000/47	9		7,33/20/44	-	Sectio	Beckenendlage
G.	3600/55	9		350.000	-	spontan	
S.	3830/55	9		370.000	-	spontan	
K.	3640/51	5	10	270.000	-	spontan	
B.	2920/47	9		360.000	-	spontan	
V.	3450/51	10		390.000	-	spontan	

GRUPPE IIa: NEUGEBORENE MIT POSITIVEM ÄTHANOLTEST.

PLASMA LÄNGE	GEWICHT 1' 5'	APGAR 7 8	pH	pCO ₂	HCO ₃ ⁻	THROMBOZYTEN	ÄTHANOLTEST	KIND MUTTER	ART	BESONDER- HEITEN
B.	2540/50	7 8	7,45/21/24	180.000	+	+	Forceps	Gemini		
B.	1890/43	8 7		165.000	+	+	Ganze Extrakt.	Gemini		
R.	2460/47	3 6		150.000	+	+	Vakuum	HT-Alteration		
G.	1580/44	3 5		135.000	+	+	spontan			
S.	2380/46	9 10		175.000	+	+	spontan	Gemini		
S.	2400/48	10		240.000	+	+	Vakuum	Gemini		
H.	3200/52	6 8	7,03/12/60	170.000	+	+	Sectio	HT-Alteration		
M.	2360/47	6 9	7,22/15/38	230.000	+	+	Vakuum			
M.	2390/46	4 7	7,13/13/50	180.000	+	+	Vakuum			
A.	1370/41	5 7		100.000	+	+	spontan			
E.	3600/54	1 1	7,15/23/40	150.000	+	+	Sectio	Grünes Fruchtw.		

GRUPPE IIb: NEUGEBORENE MIT NEGATIVEM ÄTHANOLTEST.

Z.	3870/56	9 10		210.000	-	+	spontan			
Z.	3290/51	9 10		300.000	-	+	spontan			
G.	4080/52	10		250.000	-	+	Vakuum			
S.	2490/46	7 9		280.000	-	-	spontan			
S.	3430/53	9		300.000	-	-	spontan			
P.	4050/51	9 10		250.000	-	+	spontan			
P.	3450/51	9 10		280.000	-	-	spontan			
P.	2980/51	9		240.000	-	+	spontan			
M.	3020/53	9		260.000	-	+	spontan			
B.	3300/52	10		350.000	-	+	spontan			
M.	3790/53	10		240.000	-	-	spontan			

Dabei achteten wir auf Übereinstimmung klinischer Parameter. Nur die Häufigkeit der operativen Entbindungen war in Gruppe I_a 7/12, in Gruppe I_b nur 3/12 und in Gruppe II_a 8/11 zu 1/11 in Gruppe II_b.

Im Teil II untersuchten wir außerdem noch die entsprechenden Mengen des jeweiligen mütterlichen Plasmas:

Gruppe II - M_a

Gruppe II - M_b.

2. BLUTENTNAHME.

Die Blutproben wurden unmittelbar nach Entwicklung des Kindes entnommen. Nach Abklemmen der Nabelschnur im Abstand von 30 - 50 cm von der Plazenta wurde die Nabelvene punktiert und 5 - 10 ml Blut unter konstantem Mischungsverhältnis mit dem Antikoagulans von 1:10 gewonnen: hierfür verwendeten wir Citrat 3,8 g, TES 1,38 g, 10 ml Trasylol, ad 100 ml, pH 7,5. Bei abdominaler Schnittentbindung wurde das Material aus einem abgeklemmten und abgetrennten Teil der Nabelschnur gewonnen. Bezüglich der untersuchten Parameter waren keine Unterschiede zwischen beiden Entnahmemethoden zu beobachten.

Zu gleicher Zeit wurde aus der Kubitalvene der Mutter 10 ml Blut in oben beschriebener Mischung mit dem Antikoagulans entnommen.

Die Gewinnung plättchenarmen Plasmas erfolgte durch Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge bei 4°C mit 3000 T/min. für 20 Minuten. Nach Abhebern des Plasmas mit der Pipette wurde der Äthanoltest durchgeführt und der Rest der Proben bei -25°C aufbewahrt.

3. THROMBOZYTENZÄHLUNG.

Die Zählung der Thrombozyten führten wir nach der direkten Methode unter Verwendung des Phasenkontrastmikroskops nach FEISLY und LUDIN (1949) aus, wie bei KUHN und GRAEFF (1970) beschrieben.

4. ÄTHANOLTEST.

Zum qualitativen Nachweis der Bildung löslicher Fibrinmonomerkomplexe benützten wir den Äthanoltest von GODAL und ABILDGAARD (1966) nach der Methode von KUHN und GRAEFF (1970). Dabei gaben wir zu je 0,5 ml Plasma Äthanol in einer Konzentration von 6,5 und 13,0 Prozent und beobachteten das Auftreten von Fäden oder gelartigen Gerinnseln nach 10 und 30 Minuten. Der Test wurde positiv bewertet, wenn nach 10 Minuten oben beschriebene Fäden zu beobachten waren.

5. REINIGungsverfahren.

Um eine Anreicherung von Fibrinogen und seinen Derivaten zu erreichen, wird es im Plasma gefällt nach der Methode von STRAUGHN und WAGNER (1966), modifiziert durch GRAEFF und von HUGO (1972). Kristallines β -Alanin wird bei 0°C dem gepoolten Plasma bis zu einer Konzentration von 2,5 M zugegeben, 30 Minuten vorsichtig gerührt, das ausgefällte Protein abzentrifugiert (9000 g/20 Minuten) und bei Zimmertemperatur mit TRIS - CL - Citrat-Puffer (pH 7,6) zusammen mit 100 KIU Trasylol/ml in einem Drittel des Ausgangsvolumens wieder aufgelöst.

6. AGAROSE-GEL-CHROMATOGRAPHIE.

Mit Hilfe der säulenchromatographischen Auftrennung mit 6%-iger Agarose unter Verwendung von Biogel A 5, 100 - 200 mesh, wurden die weiteren Untersuchungen durchgeführt. In der zweiten Versuchsreihe verwendeten wir 4%-ige Agarose mit Biogel A 15 m. 5 - 7 ml des β -Alanin gefällten Plasmas, annähernd 50 mg ($\pm 10\%$) Protein enthaltend, werden auf die 2,5 (bzw. 2,4) x 80 cm Säule aufgetragen und mit TRIS-CL-Puffer (pH 7,6) eluiert. Die Ausflußrate betrug 14 ml/h (bzw. 16 ml/h), wobei in 3,5 (bzw. in 4,0 ml) Portionen fraktioniert wurde.

7. RADIALE IMMUNDIFFUSION.

Der Gehalt an Fibrinogen und seinen Derivaten wurde als Fibrinogen-Fibrin- verwandtes Material (FR-Antigen) in den einzelnen Fraktionen durch einfache radiale Immundiffusion mit Partigen-Fibrinogen-Platten bestimmt. Die Durchmesser der Präzipitatringe sind der Menge des Antigens proportional (MANCINI und Mitarbeiter 1965; KUHN und GRAEFF 1970).

8. THROMBINGERINNUNGSZEIT.

Die Gerinnbarkeit wurde an Hand der Thrombingerinnungszeit geprüft. Durch die Zugabe von Thrombin kann am Grad der Verlängerung ein Rückschluß auf vorhandene Fibrin-Fibrinogen-Abbauprodukte oder auf einen Fibrinogenmangel geschlossen werden (KUHN und GRAEFF 1970).

9. DIE PAA-GEL-ELEKTROPHORESE.

Die elektrophoretische Auftrennung ausgewählter Fraktionen der Agarose-Gel-Säule wurde durch Polyacrylamid-Flachgel-Elektrophorese (ORNSTEIN 1964 , DAVIS 1964) in 5-%igem PAA-Gel erreicht, wobei wir uns der Methode von MAURER (1968) bedienten (5-%-iges Trenngel, pH 8,9, Länge $7 \pm 0,25$ cm, Tiefe 0,3 cm, Spannung 500 V, Laufzeit 75 Minuten, Sammelgel, pH 6,7, Länge $3 \pm 0,25$, Tiefe 0,3, Spannung 200 V, Laufzeit 45 Minuten, Glycin-Elektroden-Puffer, pH 8,3). Durch eine 0,001%-ige Bromphenolblaulösung wurde die Wanderungszone markiert.

Die elektrophoretische Beweglichkeit von Fibrinogen und der Fibrinmonomerkomplexe wurde nach der Formel $u = l_1 \times l_2 / V \times t$ ($\text{cm}^2 / \text{V} \times \text{sec.}$) bestimmt, wobei l_1 die Länge des Trenngels ist, l_2 die Wanderungslänge in cm, t die Zeit in Sekunden und V der während des Trennvorgangs applizierten Spannung entspricht (Wanderungsgeschwindigkeit von Fibrinogen: $0,43 \times 10^{-5}$).

Die Gelplatte erlaubt 5 gleichzeitige Läufe unter gleichen Bedingungen und ermöglicht zweidimensionale Gelelektrophoresen durch Verwendung von Gelen verschiedener Porengröße (5% / 7%) (RAYMOND 1968).

Sollte die Elektrophorese in Anwesenheit einer Substanz, die Wasserstoffbrücken zu trennen vermag, ausgeführt werden, verwendeten wir 5 molaren Harnstoff in allen Lösungen.

10. DIE INTRA-GEL-IMMUNPRÄZIPITATION.

Fibrinogen und seine Derivate wurde als FR-Antigen durch Intra-Gel-Immunpräzipitation mit monovalentem Anti-Fibrinogen-Serum vom Kaninchen identifiziert (KRIEG und WEIKER 1970). Zwei Gele werden zusammen mit 2 ml Antiserum und 8 ml TES-Puffer (pH 7,5, Ionenstärke 0,15) (BELLER und GRAEFF 1970) in einer Schale für 48 h bewegt. Der Großteil der Immunpräzipitation kann mit bloßem Auge betrachtet werden.

Die Entproteinisierung der mit einem Dialyserschlauch umwickelten Gele erfolgte in 1 l kalter TRIS-Glycin-Pufferlösung (GRAEFF , von HUGO 1972). Bei konstanter Stromzufuhr von 9 mA mußte der durch das Auswaschen der Proteine bedingte Spannungsabfall auf weniger als 100 V durch Wechsel der Pufferlösung vermieden werden. Nach ca. 30 h konnte das Gel mit Amidoschwarz gefärbt werden.

Dieses Verfahren wendeten wir sowohl beim Plasma als auch beim β -Alanin gefällten Plasma wie den ausgewählten Fraktionen der Agarose-Säule an.

11. DIE IMMUNELEKTROPHORESE.

Bei der Immunelektrophorese werden die Proteine zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend den präzipitierenden Antiseren ausgesetzt. Wir wählten dabei die Methode nach SCHEIDEGGER (1955) und brachten monovalentes Antiserum gegen α_2 -Makroglobulin, Transferrin, Kryoglobulin (CI-Globulin) und polyvalentes Antiserum gegen menschliche Serumproteine zur Anwendung. Die Immundiffusion wurde bei Zimmertemperatur für 48 - 72 h ausgeführt.

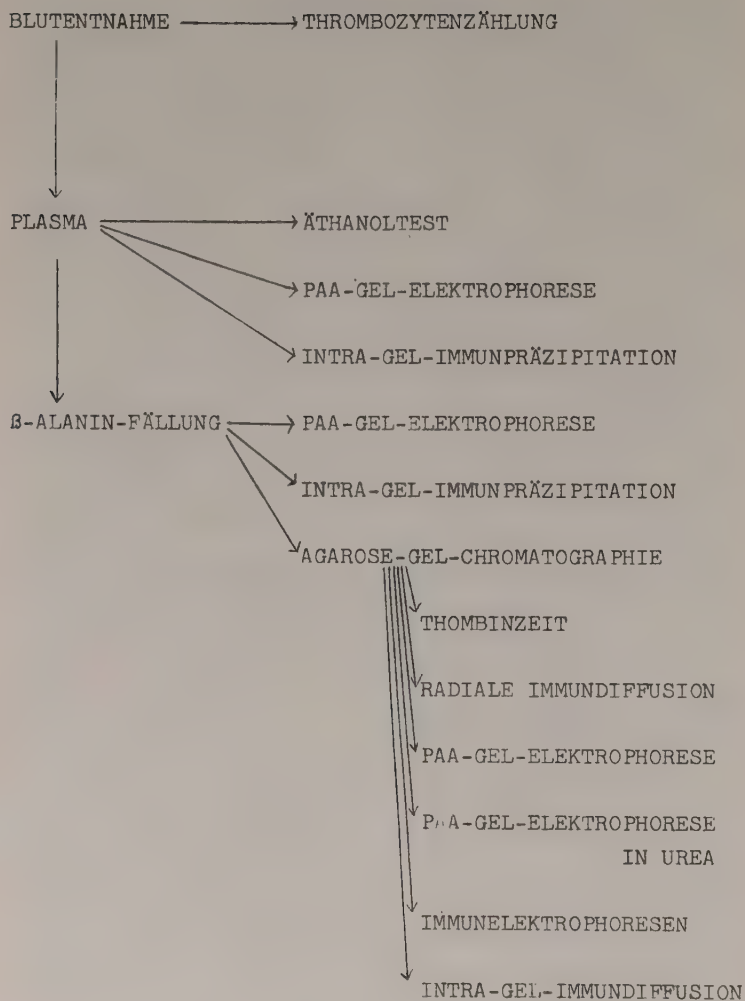


TABELLE 3: Schematische Darstellung des Arbeitsganges

C) ERGEBNISSE.

1. I. VERSUCHSREIHE:

a) Plasmen Neugeborener mit positivem Äthanoltest.

In der ersten Versuchsreihe untersuchten wir zunächst die Plasmen von 12 asphyktischen Neugeborenen der Gruppe I_a und stellten sie der Gruppe normaler Neugeborener der Gruppe I_b (siehe TABELLE 1) gegenüber.

Die in oben beschriebener Weise hergestellte, im Puffer wieder aufgenommene β -Alanin-Fällung des Plasmas ergab folgendes photometrisch in $m\mu$ gemessenes Elutionsmuster (ABBILDUNG 1): Eine Schulter wurde eluiert bei einem Elutionsvolumen von 200 ml, gefolgt von einem Peak bei 250 ml (Fibrinogen).

In den einzelnen Fraktionen bestimmten wir das FR-Antigen mit der radialen Immundiffusion und beobachteten solches Material von 180 bis 320 ml, mit einem Maximum bei 250 ml.

Gerinnbare Anteile wiesen wir durch die Thrombinzeit von 230 bis 280 ml mit einem Höhepunkt bei 250ml des eluierten Volumens nach.

Sodann untersuchten wir mit der PAA-Gel-Elektrophorese die bei 196, 217, 245 und 280 ml eluierten Volumina (ABB. 2) und fanden zwei Komponenten mit langsamerer Wanderungsgeschwindigkeit als der des Fibrinogens (Wanderungsgeschwindigkeit von Fibrinogen: $0,43 \times 10^{-5} \text{cm}^2 / \text{V} \times \text{sec}$): Bei 196 ml (ABB.2a) wiesen wir zwei Derivate mit der relativen Beweglichkeit von $0,17 \times 10^{-5} \text{cm}^2 / \text{V} \times \text{sec}$ und $0,27 \times 10^{-5}$ nach. In der 217 ml-Fraktion trat zusätzlich Fibrinogen auf (ABB. 2b). Das 0,27-Derivat stellte sich uns auch noch bei 245 ml dar, während das 0,17-Derivat

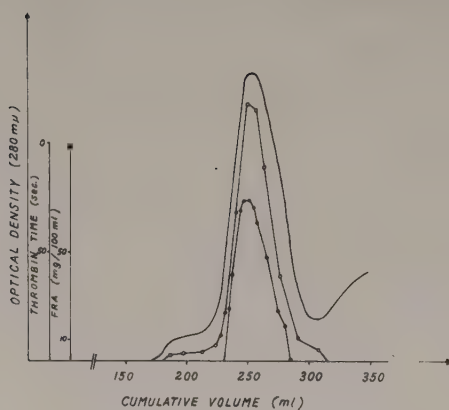


ABBILDUNG 1: Elutionsmuster der Agarose-Gel-Chromatographie des gepoolten Plasmas asphyktischer Neugeborener mit positivem Äthanoltest.
 FR-Antigen-Material —○—
 Thrombinzeit —●—
 FR-Antigen-Material mit einem höheren Molekulargewicht als dem des Fibrinogens wurde vor dem Fibrinogen-Peak eluiert.

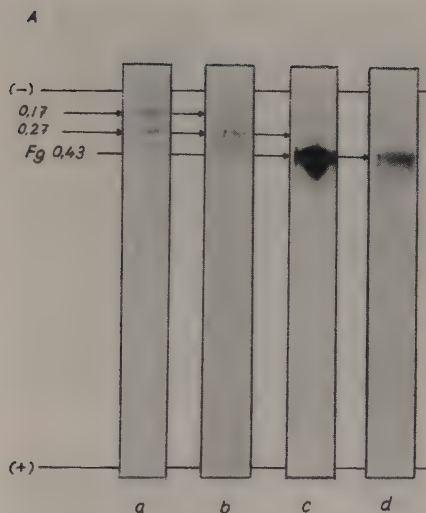


ABBILDUNG 2: PAA-Gel-Elektrophoresen der in ABB.1

gezeigten Agarose-Gel-Filtration.

Die untersuchten Volumina wurden

eluiert bei

196 (a),

217 (b),

245 (c),

280 (d).

Das 0,17-Derivat und das 0,27-Derivat

bei Neugeborenen mit positivem Äthanoltest.

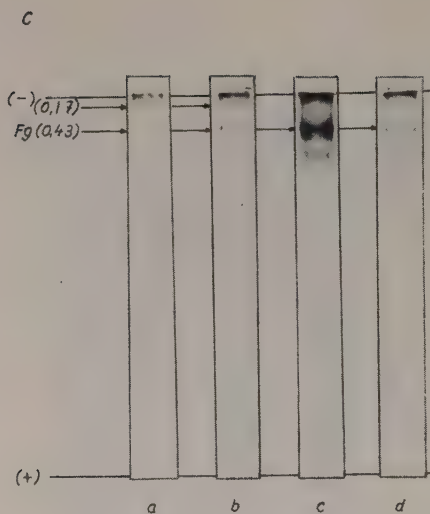


ABBILDUNG 3: Elektrophoretische Studien in 5 M Harnstoff der in ABB.2 beschriebenen Fraktionen. Das 0,27-Derivat verschwindet und an seiner Stelle erscheint Fibrinogen im Lauf 3a. Dem 0,17-Derivat entsprechende Banden sind im Lauf 3a und b zu sehen.

nicht zu sehen war(ABB. 2c). Im absteigenden Schenkel des Fibrinogen-Peaks schließlich wurde nur noch Fibrinogen nachgewiesen (ABB.2d).

Intra-Gel-Immundiffusion identifizierte die im Gel auftretenden Banden als FR-Antigen und bestätigte das Verteilungsmuster. Das gleiche Resultat lieferte diese Untersuchungsmethode bei der Bearbeitung des Plasmas und der β -Alanin-Fällung.

Bei PAA-Gel-Elektrophoresen der gleichen Fraktionen in 5 molarem Harnstoff zeigte es sich, daß zwei Komponenten in den Fraktionen bei 196 und 217 ml auftauchten (ABB. 3a und b, Seite 18): Ein Derivat, dem 0,17-Derivat entsprechend, wurde in beiden Fraktionen gefunden, während das 0,27-Derivat nicht mehr auftauchte und an dessen Stelle in der 196-Fraktion Fibrinogen zu erkennen war (ABB. 3a). In den Eluatn bei 245 und 280 ml war einzig Fibrinogen vertreten (ABB. 3c,d).

b) Plasmen Neugeborener mit negativem Äthanoltest.

Die Gel-Filtration der gepoolten Plasmafällung gesunder Neugeborener (TABELLE 1) mit negativem Äthanoltest ergab ein ähnliches Elutionsmuster (ABB. 4, Seite 20). Jedoch war die Schulter bei 200 ml eluierten Volumens nur halb so hoch wie bei Gruppe I_a. Außerdem konnten wir kein FR-Antigen in dieser Position entdecken.

Untersuchungen der entsprechenden Fraktionen des Elutionsvolumens mit PAA-Gel-Elektrophoresen ergab, daß das Gei bei 196 ml tatsächlich frei von Proteinen ist (ABB. 5a). Die Fraktionen bei 217 und 245 ml zeigten uns ein schwaches 0,27-Derivat und Fibrinogen (ABB. 5b,c). Im absteigenden Schenkel wurde nur Fibrinogen nachgewiesen (ABB. 5d). Das 0,17-Derivat stellte sich uns in keiner Fraktion dar.

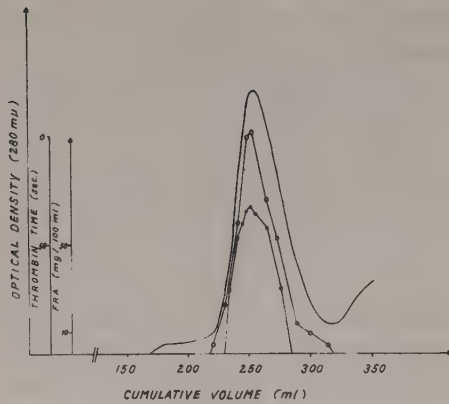


ABBILDUNG 4: Agarose-Gel-Filtration des gepoolten Plasmas gesunder Neugeborener mit negativem Äthanoltest.
FR-Antigen-Material —○—○—
Thrombinzeit —●—●—
FR-Antigen-Material mit höherem Molekulargewicht als Fibrinogen konnte vor dem Fibrinogen-Peak nicht nachgewiesen werden.

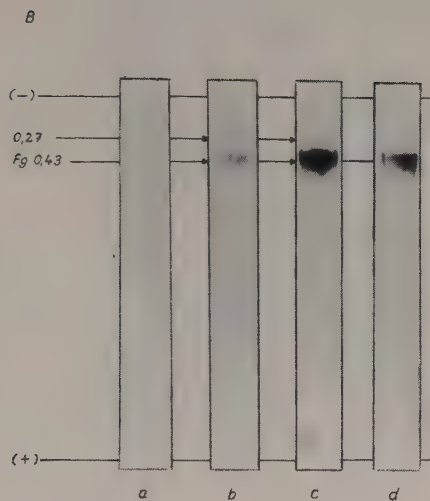


ABBILDUNG 5: PAA-Gel-Elektrophoresen der in ABB. 4
gezeigten Agarose-Gel-Filtration. Die
untersuchten Volumina wurden eluiert bei
196 (a),
217 (b),
245 (c),
280 (d).
Das 0,17-Derivat war in keiner Fraktion
vorhanden und nur eine schwache Bande,
dem 0,27-Derivat entsprechend, kam zur
Darstellung.

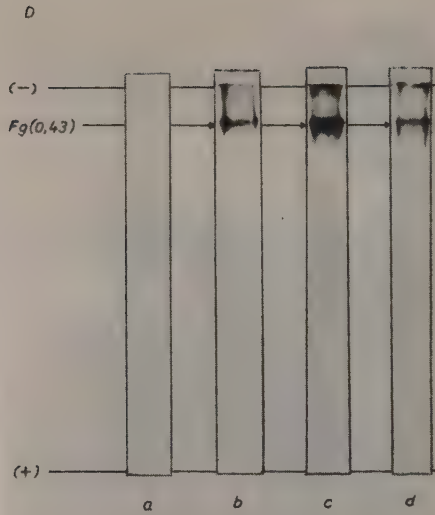


ABBILDUNG 6: PAA-Gel-Elektrophoresen in 5 M Harnstoff der in ABB. 5 beschriebenen Fraktionen. In allen Läufen ist nur die Fibrinogenbande zu erkennen.

Gel-elektrophoretische Untersuchungen in 5 molarem Harnstoff lieferten einzig Fibrinogenbanden in den Volumina bei 217, 245 und 280 ml (ABB. 6b,c,d, Seite 22).

Die Überprüfung der Befunde der einzelnen Fraktionen mit Intra-Gel-Immunpräzipitation erbrachte eine Bestätigung obiger Ergebnisse.

Bei erneuter Berechnung der relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten an einem größerem Material wurden 0,18 und 0,28 für die Derivate bestimmt.

2. II.VERSUCHSREIHE:

a) Plasmen Neugeborener mit positivem Äthanoltest und deren Müttern.

In der zweiten Versuchsreihe erweiterten wir unsere Untersuchungen auch auf die Mütter der Neugeborenen. Der Ablauf der Untersuchungen war der gleiche wie bei Teil I.

Dabei bestätigten sich die Befunde der kranken Neugeborenen: Im aufsteigenden Schenkel des Fibrinogen-Peaks bei 240 ml wurde von 152 bis 208 eine Vorschulter eluiert. FR-Antigen enthaltendes Material wurde von 160 bis 272 ml nachgewiesen und gerinnungsfähige Anteile erschienen von 220 bis 286 ml mit einem Maximum bei 240 ml (ABB. 7, Seite 24).

Die 5%-igen PAA-Gel-Elektrophoresen von Fraktionen der Schulter bei 184, 196, 208 und 240 identifizierten hauptsächlich ein Derivat mit der relativen Beweglichkeit von $0,28 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V} \times \text{sec}$ (ABB. 7, rechte Bildhälfte). Obwohl sich in der PAA-Elektrophorese keine reproduzierbare Bande in den früher eluierten Fraktionen darstellte, war doch wie auch im ersten Teil

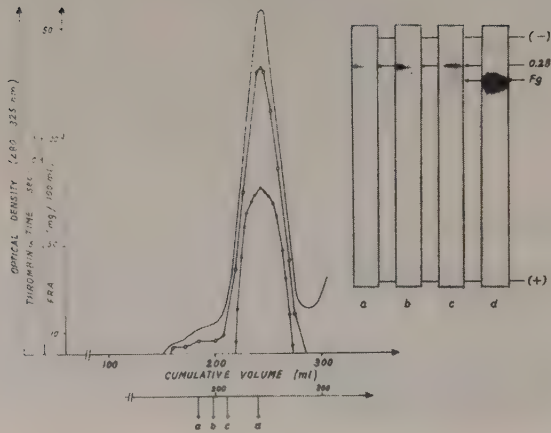


ABBILDUNG 7: Elutionsmuster der Agarose-Gel-Chromatographie des gepoolten Plasmas Neugeborener mit positivem Äthanoltest.

FR-Antigen-Material —○—○—

Thrombinzeit —●—●—

Die elektrophoretisch untersuchten Volumina sind bei

184 (a), 196 (b), 208 (c) und 240 (d).

Die elektrophoretischen Studien dieser Fraktionen sind auf der rechten Seite der Abbildung ersichtlich.

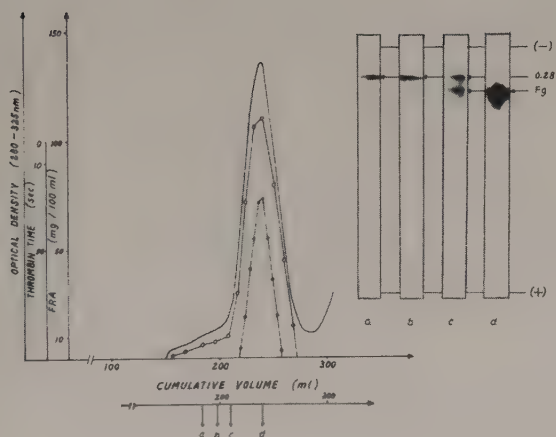


ABBILDUNG 8: Elutionsmuster der Agarose-Gel-Chromatographie und elektrophoretische Studien der 184 (a), 196 (b), 208 (c) und 240 (d) ml-Fraktionen des gepoolten mütterlichen Plasmas der Gruppe II - M_a .

FR-Antigen vorhanden; so ergab die planimetrische Auswertung der Extinktionswerte wie der FR-Antigenwerte, daß annähernd 7% des gesamten Fibrinogens vor dem Fibrinogen-Peak eluiert wurde.

Die chromatographische Auftrennung des Plasmas der dazugehörenden Mütter (Gruppe II - M_a , siehe TABELLE 2) zeigte ähnliche Befunde, nachdem ja auch der Äthanoltest bei allen Proben positiv war (ABB. 8). Die vor dem Fibrinogen-Peak erscheinende Schulter von 152 bis 208 ml des Volumens enthielt näherungsweise 5% des gesamten Fibrinogens.

Zur immunologischen Charakterisierung des 0,28-Derivates unterwarfen wir die Fraktion von 184 bis 200ml Immunelektrophoresen mit monovalenten Antiseren zu Fibrinogen, CI-Globulin, α_2 -Makroglobulin und Transferrin und außerdem noch zu polyvalentem Antiserum zu menschlichen Serumproteinen. Nur eine Präzipitatlinie wurde beobachtet, die ähnlich war der von Fibrinogen und nahe dem Antigenursprung mit Antiserum zu FR-Antigen (vergleiche TABELLE 4).

Antiserum zu	Intra-Gel- Immun- präzipitation	Immun- elektro- phorese	Radiale Immun- diffusion
FR-Antigen	+	+	+
CI-Globulin		-	
Transferrin		-	
α_2 -Makro- globulin		-	
menschliches Serumprotein	-	-	

TABELLE 4: Immunologische Charakterisierung
0,28-Derivates.

b) Plasmen Neugeborener mit negativem Äthanoltest
und deren Müttern.

Die Untersuchungsbefunde der Kontrollgruppe äthanoltest-negativer Kinder bestätigten die vorhergehenden (Gruppe II_b, TABELLE 2). Weder photo-metrisch noch immunologisch ließ sich eine Vorschulter nachweisen (ABB. 9, Seite 28). Auch die PAA-Gel-Elektrophorese enthielt nur eine Bande, nämlich die des Fibrinogens.

Die mütterlichen Plasmen wiesen in 5 von 11 Fällen einen positiven Äthanoltest auf und so fanden wir auch eine schmale Vorschulter vor dem Fibrinogen (ABB. 10), die annähernd 2% des gesamten Fibrinogens enthielt. Die gel-elektrophoretische Auftrennung lies uns ein ziemlich schwaches 0,28-Derivat bei 196 und 208 ml erkennen.

Auch hier, wie bei allen vorausgegangenen Versuchen wurden Intra-Gel-Immunpräzipitationen mit Anti-Fibrinogen-Serum vom Plasma, vom β -Alanin-gefällten Plasma und den einzelnen Fraktionen vorgenommen, die die obigen Befunde bestätigten.

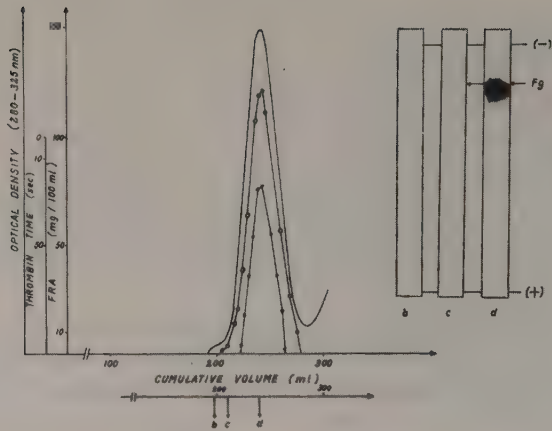


ABBILDUNG 9: Elutionsmuster der Agarose-Gel-Chromatographie und elektrophoretische Studien der 184 (a), 196 (b), 208 (c) und 240 (d)-ml-Fraktion des gepoolten Neugeborenenplasmas mit negativem Äthanoltest (Gruppe II_b).

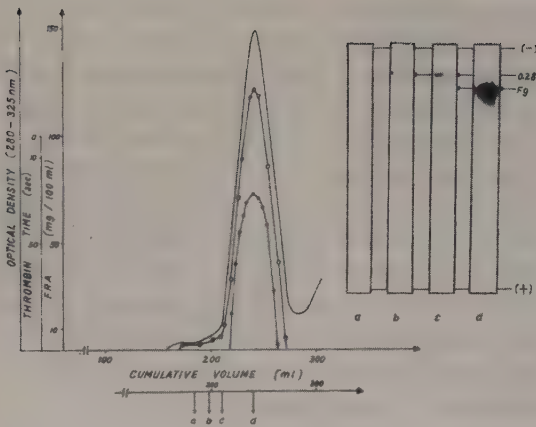


ABBILDUNG 10: Elutionsmuster der Agarose-Gel-Chromatographie und elektrophoretische Studien der 184 (a), 196 (b), 208 (c) und 240 (d)-ml-Fraktion des gepoolten mütterlichen Plasmas der Gruppe II - M_n

D) DISKUSSION.

Die vorliegende Arbeit versucht an Hand einer größeren Anzahl von Fällen, die bisher erhobenen Befunde vom Auftreten zweier höhermolekularer Derivate des Fibrinogens im Plasma von Patienten mit biochemischen Zeichen von disseminierter intravasalen Gerinnung, insbesondere von asphyktischen Neugeborenen und von Schwangeren, zu erweitern.

Aus diesem Grunde und um die säulenchromatographischen Untersuchungen durchführen zu können, mußten wir die Plasmen von jeweils 12 bzw. 11 Einzelproben poolen. Eine solche Anzahl war notwendig, da bei Neugeborenen nur 2 - 4 ml Plasma, nach Abzug des Materials für den Äthanoltest, zur Verfügung standen.

Eine genaue Auftrennung des mit β -Alanin gefällten Plasmas war uns durch Anwendung der Agarose-Gel-Chromatographie und anschließenden elektrophoretischen Studien der einzelnen eluierten Fraktionen möglich.

Die Fraktionierung erfolgte dabei entsprechend der Molekülgröße und die Elutionsposition läßt Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der in den einzelnen Elutionsvolumina gefundenen Materialien zu:

Frühe Elution deutet auf höheres Molekulargewicht hin.

Die elektrophoretischen Studien wurden mit 5%-igem Polyacrylamid durchgeführt, wodurch die Proteine gemäß ihrer elektrophoretischen Mobilität und ihrer Molekülgröße aufgespaltet werden. So wandern Abbau-
produkte mit niedrigerem Molekulargewicht schneller, während jene mit größerem Molekulargewicht kaum ins Gel eindringen (MARDER 1971).

Mit diesen Methoden gelang es uns bei der Auftrennung der Plasmaproben asphyktischer Neugeborener mit biochemischen Zeichen einer intravasalen Gerinnung einschließlich eines positiven Äthanoltestes zwei Komponenten vor dem Fibrinogen nachzuweisen:

Das 0,18-Derivat wurde nur in der Schulter vor dem Fibrinogen-Peak eluiert, während das 0,28-Derivat in Fraktionen der Schulter des Fibrinogen-Peakes und des aufsteigenden Schenkels gefunden wurde. So wird deutlich, daß das Molekulargewicht des 0,18-Derivates höher als das des 0,28-Derivates und beider Molekulargewicht höher als das des Fibrinogens ist.

Es bestätigte sich damit, was schon durch Anwendung der PAA-Gel-Elektrophorese an Einzelproben und durch zweidimensionale PAA-Gel-Elektrophorese über das Molekulargewicht ausgesagt worden war (GRAEFF und Mitarbeiter 1973).

In der ersten Versuchsreihe (Gruppe I_a, ABB. 1 und 2) kamen beide Derivate zur Darstellung, im zweiten Teil (Gruppe II_a, ABB. 7) hauptsächlich das 0,28 Derivat. Wahrscheinlich tritt das 0,18-Derivat nur bei ausgeprägten Zuständen von disseminierter intravasalen Gerinnung auf, was auch durch die unterschiedliche Sterblichkeitsrate in den beiden Serien vermutet werden kann. In Fällen ausgeprägter disseminierter intravasalen Gerinnung, von Eklampsie, vorzeitiger Lösung der Plazenta (GRAEFF, von HUGO 1972, 1973), ebenso in Beispielen schwerer Asphyxie beim Neugeborenen (GRAEFF und Mitarbeiter 1973) werden ebenfalls beide Derivate beobachtet.

Allerdings sahen wir in dieser Gruppe II_a FR-Antigen, dessen Molekulargewicht größer als das des 0,28-Derivates war, dessen Konzentration aber nicht ausreichte, um in einer reproduzierbaren Bande zu resultieren.

Zur Frage der Bindung zwischen den Fibrinmonomeren bzw. zwischen Fibrinogen und Fibrinmonomeren überprüften wir das Verhalten der beiden Derivate in einem Medium, das Wasserstoffbrücken zu spalten vermag und ließen Proben im PAA-Gel in Anwesenheit von 5 M Harnstoff wandern.

Das 0,28-Derivat erwies sich als nicht beständig, an seiner Stelle trat jedoch eine Komponente mit dem Wanderungsverhalten von Fibrinogen auf. Obwohl die eluierten Mengen an der unteren Grenze der Empfindlichkeit der PAA-Gel-Elektrophorese sind, läßt sich zusammen mit den immunologischen Befunden (siehe unten) und unter Berücksichtigung des Wanderungsverhaltens in Natrium Dodecyl Sulfat (NDS) (HAFTER und Mitarbeiter 1973) folgende Vermutung anstellen:

Bei dem 0,28-Derivat handelt es sich teils um ein kovalent gebundenes Dimer, teils um einen dissoziierten Fibrinogen-Fibrin-Monomerkomplex, der in Harnstoff dissoziiert. Ein ähnlicher Komplex konnte beobachtet werden nach in vitro Zugabe kleiner Mengen von Thrombin zu Plasma (von HUGO, GRAEFF 1973). Diese Aussage wurde von KIERULF (1973) bestätigt. Möglicherweise entsteht dieses Derivat in vivo durch Einwirken von Thrombin oder eines thrombinähnlichen Enzyms auf Fibrinogen. Dieser Komplex mag auch mit den von SHAINOFF und PAGE (1962) und HARDER und STRAUB (1972) beschriebenen übereinstimmen. FLETCHER (1970) vermutet solch ein Derivat bei Patienten mit Hyperkoagulabilität.

Da das 0,18-Derivat in Anwesenheit von Harnstoff beständig bleibt, liegt der Schluß nahe, daß dieser Komplex hauptsächlich aus kovalent gebundenen Anteilen besteht. Bei Berücksichtigung aller bisherigen Ergebnisse könnte man schließen, daß es sich hier um ein Fibrin-i-Derivat (Defekt-Polymer) handelt, das durch ein kombiniertes Thrombin-Plasmin-Einwirken auf Fibrin oder Fibrinogen entsteht (von HUGO, GRAEFF 1973).

Die immunologischen Untersuchungen charakterisierten die beobachteten Derivate eindeutig als FR-Antigen. Eine besonders eingehende Betrachtung des 0,28-Derivates durch Immunelektrophoresen bewies, daß keine anderen Serumproteine enthalten sind, wie man sie auf Grund des α_2 -Makroglobulin-ähnlichen Wanderungsverhaltens oder des Anreicherungsverfahrens mit β -Alanin vermuten könnte, bei dem Verunreinigungen mit α_2 -Makroglobulin, Transferrin und Albumin vorhanden sein können (MOSSESSON, UMFLEET 1970).

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse des Plasmas der gesunden Neugeborenen, bei denen wir das 0,18-Derivat in keiner der beiden Versuchsreihen finden konnten. Nur die 0,28-Komponente war mit einer schwachen Bande vertreten. Ähnliches wurde bereits bei der Untersuchung der Einzelproben gefunden. Man mag nun vermuten, daß die geringe Menge 0,28-Derivat nicht ausreichend war, um einen positiven Äthanoltest zu erwirken. Genauso muß man daran denken, daß das gelegentliche Auftreten dieser Thrombinderivate auf technische Probleme beim Sammeln der Blutproben zurückzuführen war. Möglicherweise

wäre aber auch das Vorhandensein eines Frühstadiums intravasaler Gerinnung, nämlich der Hyperkoagulabilität, zu diskutieren.

Gleichzeitig mit dem Auftreten der beiden beschriebenen Derivate war ein signifikanter Abfall der Thrombozyten und des Fibrinogens zu verzeichnen, vergesellschaftet mit Zeichen der Asphyxie, zum Beispiel niedriger Apgar-Werte, Absinken des Blut-pH, Alteration der kindlichen Herztöne, so daß das Auftreten der höhermolekularen Komponenten als ein Anzeichen einer Verbrauchskoagulopathie angesehen werden kann.

Ähnliches beobachtete auch CHADD und Mitarbeiter (1971), wie auch BLEYL und BÜSING (1970) das gehäufte Auftreten von intravasalen Mikrothromben bei in der Perinatalperiode verstorbenen Neugeborenen beschrieben hat.

Während das Vorhandensein der beschriebenen Derivate Rückschlüsse auf den Zustand des Kindes zuzulassen scheint, scheint das Auftreten dieser Komplexe im mütterlichen Organismus ein ziemlich häufiges Phänomen zu sein. Dies könnte in Verbindung stehen mit der in der Schwangerschaft auftretenden Hyperkoagulabilität. Allerdings mag auch eine Beziehung bestehen zwischen Häufigkeit von Komplikationen und Operationen, da das qualitative und quantitative Ansteigen der Komplexe bei der Mutter mit dem Ansteigen der Operationsrate korreliert zu sein scheint.

E) ZUSAMMENFASSUNG.

Gesammelt wurden 46 Plasmen von Neugeborenen und in 22 Fällen auch von deren Müttern. In zwei Versuchsreihen wurde aus 12 bzw. 11 Einzelproben jeweils ein Pool gebildet.

In dem mit β -Alanin gefällten Plasma wurde mit Hilfe der Agarose-Gel-Chromatographie FR-Antigen-Material in einer Schulter vor dem Fibrinogen-Peak eluiert; durch PAA-Gel-Elektrophoresen gelang der Nachweis zweier höhermolekularer Derivate des Fibrinogens, deren relative elektrophoretische Beweglichkeit mit $0,18$ und $0,28 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V} \times \text{sec}$ (Fibrinogen $0,43 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V} \times \text{sec}$) angegeben werden kann.

Durch radiale Immundiffusion, Intra-Gel-Immundiffusion und Immunelektrophoresen identifizierten wir sie als FR-Antigen.

Aus Elektrophoresen in 5 M Harnstoff konnten wir schließen, daß das 0,18-Derivat sich vorwiegend aus untereinander kovalent gebundenen Komponenten zusammensetzt und daß es sich dabei möglicherweise um ein Plasminderivat quervernetzten Fibrins (Defektpolymer) handelt.

Das 0,28-Derivat kann teils als ein kovalent gebundenes Dimer, teils als Fibrinogen-Fibrin-Monomerkomplex angesehen werden, das durch die Wirkung von Thrombin oder eines thrombinähnlichen Enzyms auf Fibrin entstanden ist.

Die beschriebenen Derivate wurden im Nabelvenenblut asphyktischer Neugeborener beobachtet und ihr Auftreten war mit einem statistisch signifikanten Abfall der Thrombozyten, des Fibrinogens und mit Zeichen fetaler Asphyxie korreliert.

Im mütterlichen Blut konnte das 0,28-Derivat häufig gesehen werden und ist möglicherweise Ausdruck der in der Schwangerschaft auftretenden Hyperkoagulabilität.

F) LITERATURVERZEICHNIS.

- BELLER, F.K., H. GRAEFF: Equipment and general requirements of the coagulation laboratory. In: Methods and theories of blood coagulation. N. Bang, F.K. Beller, E. Deutsch, E. Mammen, Eds. Academic Press: New York; Thieme, Stuttgart, 1970, p. 57
- BLEYL, U., C.M. BÜSING: Kreislaufschock und disseminierte intravasale Gerinnung bei intrauterinem und perinatalem Fruchttod. Klin. Wsch., 48 (1970) 13
- CHADD, M.A., P.C. ELWOOD, O.P. GRAY, S.M. MUXWORTHY: Coagulation defects in hypoxic full-term infants. Brit. med. J. I (1971) 516
- DAVIS, B.J.: Disc-electrophoresis - II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. (1964) 404
- FEISSLY, R., H. LUDIN: Microscopie par contrastes de phases. Rev. hémat. 4 (1949) 481
- FLETCHER, A.P., N. ALKJAERSIG, J.O. BRIEN : Blood hypercoagulability and thrombosis. Abstract volume, XIII. Int. Congress Hematol., Munich, p. 244 (1970)

GRAEFF, H., K. WRESCHNIOK
R. von HUGO :

Identification of fibrin and/or fibrinogen degradation products in plasma samples by PAA gel electrophoresis and intra gel immunoprecipitation. In: Abstract volume, II.Int. Congress on Thrombosis and Haemostasis, Oslo, (1971)p.150

GRAEFF, H., R. von HUGO:

Identification of fibrinogen derivatives in plasma samples. Thromb. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 27 (1972) 610

GRAEFF, H., R. von HUGO, W. KUHN,

H. SCHOLZ, A. ERNST, R. GASTROPH: Fibrinogen derivatives with a higher molecular weight than that of the parent molecule in cord vein plasma of newborns. I. Identification in single plasma samples.
Klin. Wschr. 51 (1973) 695

GRAEFF, H., R. von HUGO:

Fibrinogen derivatives with a higher molecular weight than that of fibrinogen in a case of premature separation of the placenta. Zur Veröffentlichung eingereicht.

GODAL, H.C., U. ABILDGAARD:

Gelation of soluble fibrin in plasma by ethanol. Scan. J. Haematol. 3 (1966) 342

HAFTER, R., H. GRAEFF,
R. von HUGO :

Derivate des Fibrins in der Perinatalperiode. Charakterisierung einzelner Fraktionen. Presented at the Symposium on Fibrinogen, June 15, 1973, M.P.I. für Biochemie, Martinsried/München

- HARDER, A.J., P.W. STRAUB: In vitro and in vivo induction of cryofibrinogen and "parcoagulation" by reptilase. Thromb. Diathes. haemorrh. (Stuttg.), 2 (1972) 337
- von HUGO, R., H. GRAEFF: Fibrin-i-degradation products with a molecular weight higher than that of fibrinogen. Thromb. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 29(1973)122
- von HUGO, R., H. GRAEFF: Formation of soluble fibrin monomer complexes in human plasma. Thrombosis Research, (1973) in press.
- KIERULF, P. : Isolation and characterization of the clottable proteins obtained from plasma by gelation with ethanol. IV. Int. Congress Thrombosis and Haemostasis, Vienna, (1973) Abstract volume, p.385
- KUHN, W., H. GRAEFF: Gerinnungsstörungen in der Geburtshilfe. Stuttgart: Thieme 1970
- KUHN, W., G. BRÖCKER, H. GRAEFF, U. BLEYL, H. FROST: Nachweis von Fibrinmonomeren im Nabelvenenblut. Klin. Wschr. 49 (1971) 106
- KRIEG, M., H. WEICKER : Die immunologische Identifizierung und Lokalisierung der Proteinfractionen nach disk-elektrophoretischer Trennung auf Polyacryamidgel. Z. klin. Chem. klin. Biochem. 8 (1970) 293

- MANCINI, G., J.P. VAERMAN, A.O.
CARBONARA, J.K. HEREMANS: A single-radial-diffusion method for the immunological quantitation of proteins. In: Proceedings XI. Colloquium proteins of the biological fluids, hsg. von H. Peeters, Elsevier, Amsterdam 1964
- MARDER, V.J. : Identification and purification of fibrinogen degradation products produced by plasmin : considerations on the structure of fibrinogen. In: Fibrinogen Degradation Products. M. Verstraete, J. Vermeylen and M.B. Donati, Eds. Scand. J. Haematol. Suppl. 13 (1971) 21
- MAURER, H.R.: Disk-Elektrophorese . Walter de Gruyter & Co, Berlin 1968
- MOSESSEN, M.W., R.A. UMFLEET: The cold-insoluble globulin of human plasma. J. Biol. Chem. 245 (1970) 5728
- ORNSTEIN, L.: Disc-electrophoresis - I. Background and theory. Ann. N. Y. Acad. Sc. 121 (1964) 321
- RAYMOND, S.: Acrylamide gel electrophoresis. In: Methods in immunology and immunochemistry, C.A. Williams and M.W. Chase, Eds. Academic Press, New York, p. 47, 1968

- SCHEIDEGGER, J.J. : Une micro-méthode de l'immuno-electrophorèse. Intern. Arch. Allergy, 7 (1955) 103
- SHAINOFF, J.R., J.H. PAGE : Significance of cryoprotein conversation. J. exp. Med., 116 (1962) 687
- STRAUGHN, W. III, R.H. WAGNER : A simple method for preparing fibrinogen. Thromb. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 16 (1966) 198
- VERMYLEN, J., M.B. DONATI, M. VERSTRAETE : The identification of fibrinogen derivatives in plasma and serum by agarose gel filtration. In: Fibrinogen degradation products. M. Verstraete, J. Vermynen and M.B. Donati, Eds. Scand. J. Haematol. Suppl. 13, (1971) 219

Meinem verehrten Doktorvater Herrn Privat-Dozenten Dr. med. Henner Graeff möchte ich meinen aufrichtigen Dank aussprechen für die Überlassung des Themas und die großzügige Förderung, die er in jeder Hinsicht meiner Arbeit hat zukommen lassen.

Herrn Professor Dr. med. Josef Zander erlaube ich mir zu danken für die Arbeitsmöglichkeiten in seiner Klinik und für die Übernahme des Korreferats.

Ebenso sei des guten Einvernehmens mit Herrn Dr. rer. nat. R. Hafter und Dr. med. R. von Hugo gedacht.

Für die gewissenhafte technische Auswertung des Materials bedanke ich mich bei Fräulein Eva Hoffmann, für die Bilder bei Fräulein Wellner.

Dank auch an alle Mitarbeiter im Kreißsaal, durch deren Mithilfe das Sammeln der Blutproben erleichtert wurde.

LEBENS LAUF

Am 3. Juli 1949 wurde ich als jüngstes von fünf Kindern des Pfarrers Friedrich Gastroph und seiner Ehefrau Margarethe in Würzburg geboren.

In München besuchte ich vier Jahre lang die Volksschule und neun Jahre das Humanistische Luisengymnasium für Mädchen, an dem ich 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München, legte im September 1969 die naturwissenschaftliche und im April 1971 die ärztliche Vorprüfung ab. Die ärztliche Prüfung bestand ich im Juli 1974 mit der Note sehr gut.

Ab 1. September 1974 werde ich als Medizinalassistentin an der I. Frauenklinik der Universität München tätig sein.

